

高效液相色谱与质谱联用分析测定 川芎中有效成分阿魏酸与藁本内酯

孔 亮 于志远 邹汉法* 孙乃昌 吴丽华 倪坚毅

(中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心,大连 116011)

摘 要 采用 HPLC-MS 系统地研究了中药川芎有效成分阿魏酸 (*ferulic acid*) 和藁本内酯 (*ligustilide*) 的定量分析方法。利用制备色谱制备了藁本内酯对照品,并对其进行了紫外光谱、质谱、红外光谱等结构鉴定。分别考察了水、甲醇、乙醇、95%乙醇 4 种溶剂以及提取时间对川芎中阿魏酸和藁本内酯提取量的影响。结果表明:水是阿魏酸的最佳提取溶剂,提取时间 45 min 为宜;乙醇是适合提取藁本内酯的溶剂,提取时间 75 min 为宜。以外标法对市售川芎中的阿魏酸与藁本内酯进行了定量分析,二者含量分别是 0.15% (*m/m*) 和 0.82% (*m/m*)。

关键词 高效液相色谱与质谱联用,川芎,质量控制,阿魏酸,藁本内酯

1 引 言

川芎 (*Rhizoma Chuanxiong*) 为伞形科植物川芎 (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) 的干燥根茎,具有行气活血、祛风止痛之功效,为活血化瘀常用中药。据报道其含有内酯类、生物碱、有机酸类或酚类以及中性油类等多种有效成分^[1,2]。中药作为天然产物,有效成分含量易受产地、气候、加工工艺等因素的影响,因此,中药质量控制是保证其药效稳定的重要技术课题^[3,4]。由于阿魏酸 (*ferulic acid*) 与藁本内酯 (*ligustilide*) 是川芎的主要活性成分(其分析结构见图 1),因此,对二者或其中之一的定量分析应用于质量控制的研究较多,如:薄层色谱法 (TLC)、分光光度法、高效液相色谱法 (HPLC)、气/液质联用 (GC/LC-MS)、毛细管电泳 (CE) 及指纹图谱 (FPS) 等^[5~11]。本实验采用高效液相色谱与质谱联用对川芎中的阿魏酸和藁本内酯两种主要有效成分进行定性、定量分析。

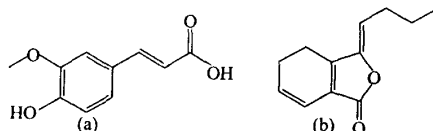


图 1 阿魏酸 (a) 和藁本内酯 (b) 的分子结构式

Fig. 1 Molecular structure of ferulic acid (a) and ligustilide (b)

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

LCMS-2010 型液相色谱质谱联用仪 (日本岛津公司); LC-8A 高效液相制备色谱仪, SPD-10Avp 紫外可见检测器 (日本岛津公司); 7725i 进样阀 (美国 Rheodyne 公司), WDL-95 色谱工作站 (国家色谱研究分析中心,大连)。C₁₈ 色谱柱 (分析型 4.0 mm × 200 mm i. d., 5 μm; 制备型 8.0 mm × 250 mm i. d., 5 μm, 色谱填料均为 Kromasil) 和 DL 型固相萃取器及萃取柱 (国家色谱研究与分析中心)。

乙腈 (色谱纯, 上海陆都化学试剂厂); 无水乙醇 (分析纯, 天津石英钟厂霸州市化工分厂); 甲醇 (色谱纯, 山东禹王实业有限公司禹城化工厂); 95% 乙醇 (分析纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心); 无水乙醚 (分析纯, 天津市博迪化工有限公司); 冰醋酸 (分析纯, 沈阳市联邦试剂厂); 川芎 (购于当地中药店); 藁本内酯从川芎中制备, 用制备高效液相色谱进一步纯化; 阿魏酸购于 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA); 纯水经 Milli-Q 水处理系统 (美国 Millipore 公司) 纯化。

2.2 单味中药的提取

准确称取 10 g 经粉碎的川芎粉末 (粒径 0.5 mm) 置入烧瓶内, 加入 75 mL 的水/甲醇/乙醇/95% 乙醇浸泡 30 min, 回流煮沸计时, 将提取液经微孔滤膜 (0.5 μm) 过滤得到进样溶液。

2003-10-31 收稿; 2004-02-12 接受
本文系国家自然科学基金资助项目 (No. 90209056)

考察提取时间时,采用两口烧瓶,其中之一与回流冷凝管相连,另外一个瓶口用玻璃塞密封,可用于定时取样。为防止长时间加热引起提取液蒸发而导致溶液损失,将回流冷凝管溢出的蒸汽再冷凝回到提取液中。在加热过程中定时从提取液中抽取样品 0.1 mL,离心过滤后即得进样溶液。

定量分析时,川芎提取液要经过 SPE 预处理:精确移取 3 mL 提取液加入到经活化的 SPE 柱中(250 mg C_{18} , 40 μm ,活化条件:5 mL 乙腈淋洗后,用 6 mL 水淋洗备用。)滤过,收集滤液;再精确移取 1 mL 乙腈淋洗,收集滤液;合并滤液,并转移至 50 mL 容量瓶中定容得分析样品溶液。

2.3 色谱条件

定量分析:流动相 A 为乙腈(含 0.1% 乙酸);流动相 B 为水(含 0.1% 乙酸)。梯度洗脱,0 ~ 8 min 30% A ~ 50% A; 8 ~ 40 min 50% A。流速 0.76 mL/min,二极管阵列检测器检测。

色谱制备:流动相为 50% 甲醇,流速 3.0 mL/min,280 nm 检测。

2.4 藁本内酯的制备

称取经粉碎的当归 160 g 置入烧瓶内,加入 700 mL 无水乙醇,浸泡 30 min,加热回流 1 h,过滤(0.5 μm)制备提取液。40 $^\circ\text{C}$ 减压蒸馏挥发掉提取液中溶剂得膏状物。以装有 30 g 的 40 μm C_{18} 填料的 SPE 柱分离上述提取物,分别用 30/70,50/50,20/80 (V/V) 的甲醇/水溶液和纯甲醇淋洗,收集洗脱的馏分。经液/质联用分析,藁本内酯在 80% 甲醇溶液洗脱的馏分中。40 $^\circ\text{C}$ 减压蒸馏挥发掉溶剂得膏状物。以制备型 C_{18} 柱纯化经初步提纯的藁本内酯。经固相萃取(SPE)柱浓缩,减压蒸馏挥发掉溶剂,得到纯度大于 98% 的藁本内酯。藁本内酯最终由 RP-HPLC、紫外光谱、质谱及红外光谱作结构鉴定。

2.5 标准溶液的配制

精确称取 16.0 mg 藁本内酯,将其转入 25 mL 容量瓶中,5050 (V/V) 乙腈/水溶液溶解,定容至刻度。移取 2 mL 所配溶液,用 5050 (V/V) 乙腈/水溶液稀释于 50 mL 容量瓶中,定容后制成进样溶液。

精确称取 19.3 mg 阿魏酸标准品,将其转入 50 mL 容量瓶中用 5050 (V/V) 乙腈/水溶液溶解,定容至刻度。准确移取 3 mL 所配溶液至 50 mL 容量瓶中,定容至刻度制成进样溶液。

3 结果与讨论

3.1 川芎中阿魏酸与藁本内酯的结构鉴定

川芎的水提取物与乙醇提取物的色谱分离图见图 2。其中 1 号峰的紫外光谱图与阿魏酸对照品一致(见图 3 A),HPLC-MS 测得分子离子峰的分子量为 193 [$M - H^+$] (图略),从而可以确定 1 号峰是阿魏酸。通过 HPLC-DAD 获得 2 号峰的紫外光谱图,分别在 206、280、326 nm 有 3 个吸收峰(见图 3 b),HPLC-MS 测得分子离子峰的分子量为 232 [$M + H^+ + CH_3CN$] (图略),制备 2 号峰(见实验部分),并测定其红外光谱,主要的红外吸收峰(cm^{-1})是:3049 (C-H),1764 (内酯键)、1670、1624 (C=C=C),1272、961 (C=C),光谱数据与标准的藁本内酯红外谱图一致^[12],确定为藁本内酯。

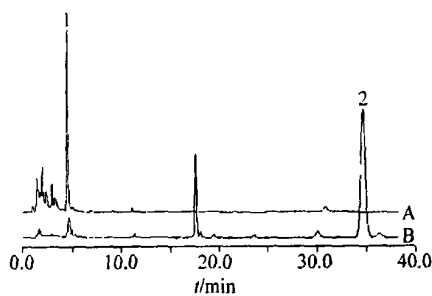


图 2 川芎的水提取物(A)和乙醇提取物(B)的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of water extracts (A) and ethanol extracts (B) from *Rhizoma Chuanxiong*
1. 阿魏酸 (ferulic acid); 2. 藁本内酯 (ligustilide)。

3.2 对川芎的提取溶剂及提取时间的考察

实验考察了水、甲醇、乙醇及 95% 乙醇 4 种溶剂及加热提取时间对川芎活性成分浸出量的影响。4 种溶剂在提取川芎的实验中,随着加热时间的变化,在 C_{18} 色谱柱上保留组分含量(色谱峰面积)相应发生变化。以阿魏酸、藁本内酯为指标,分别测定二者色谱峰面积随提取时间的变化趋势。从图 4 中可知,水作为阿魏酸的提取溶剂的浸出效率最高,在 45 min 时达到最大值。由于水的沸点高,阿魏酸随着加热浸出时间的延长缓慢分解,峰面积逐渐减少。95% 乙醇在 120 min 时阿魏酸的提取量达到极值,随后峰面积因阿魏酸的分解相应减少。甲醇与乙醇的提取量随时间缓慢增加,但提取

量要低于水。

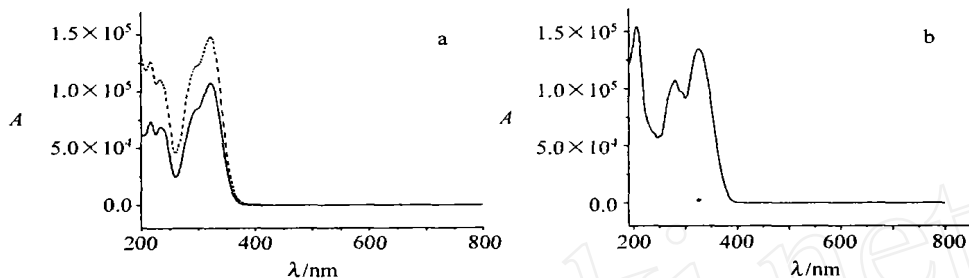


图 3 阿魏酸与藁本内酯的紫外光谱图

Fig. 3 Ultraviolet (UV) spectra for ferulic acid and ligustilide

a. 阿魏酸对照品()与色谱峰 1()的紫外光谱图(UV spectra for standard of ferulic acid () and peak 1 ()); b. 色谱峰 2 的紫外光谱图(UV spectrum of peak 2)。峰 1 和峰 2 见图 2 (peak 1 and peak 2 are shown in Fig. 2)。

在 4 种溶剂中,水作为提取藁本内酯溶剂的提取量最低(见图 5);乙醇、95%乙醇、甲醇分别在 75、105 和 135 min 时藁本内酯的峰面积达到最高值。由此可见,水不适合用于提取象藁本内酯这样的疏水性成分,而另外 3 种溶剂对藁本内酯的最高提取量基本相同,但乙醇耗时短,更适用于提取藁本内酯。从以上数据可以看出,提取川芎中的阿魏酸时,水的沸点比较高,长时间加热会使阿魏酸分解或转化,最佳提取时间为 45 min;提取藁本内酯时,乙醇无疑是上述 4 种溶剂中的最佳溶剂,提取时间以 75 min 为宜。

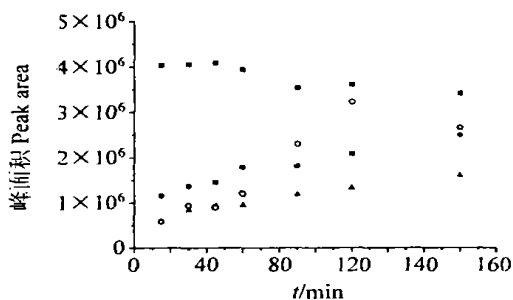


图 4 溶剂与提取时间对川芎中阿魏酸浸出的影响

Fig. 4 Effect of the extracting time on the extracted amount of ferulic acid in Rhizoma Chuanxiong with different solvents

() 水(water); () 甲醇(methanol); () 乙醇(ethanol); () 95%乙醇(ethanol)。

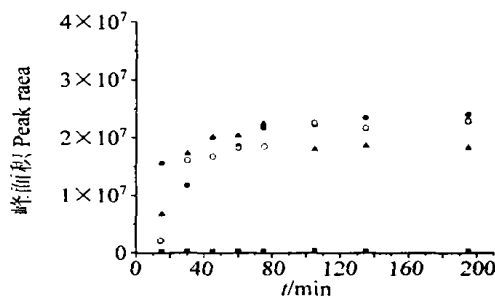


图 5 溶剂与提取时间对川芎中藁本内酯浸出的影响

Fig. 5 Effect of the extracting time on the extracted amounts of ligustilide in Rhizoma Chuanxiong with different solvents

() 水(water); () 甲醇(methanol); () 乙醇(ethanol); () 95%乙醇(ethanol)。

3.3 市售川芎中阿魏酸与藁本内酯的定量分析

实验使用的所有提取液都经过 SPE 处理,原因是中药的提取液中有大量的非极性成分,其在反相色谱柱上保留极强,尤其是在 C₁₈柱上,造成分析时间过长,影响分析效率。经过 SPE 处理后,强保留的非极性成分大部分被除去,从而缩短了分析时间。采用外标法对市售川芎提取液中的阿魏酸与藁本内酯进行定量。阿魏酸与藁本内酯的标准曲线方程如下:

阿魏酸:

$$y = (1.88697 \times 10^{-7} \pm 2.55164 \times 10^{-9}) x - (0.00192 \pm 0.00248), r = 0.99973, n = 5, P < 0.0001$$

藁本内酯:

$$y = (2.10833 \times 10^{-7} \pm 7.01107 \times 10^{-10}) x + (0.00217 \pm 0.00193), r = 0.99998, n = 5, P < 0.0001.$$

y 为进样量(μg), x 为峰面积(325 nm)。检测结果及精密度实验见表 1。

根据样品溶液的配制,可以计算出阿魏酸与藁本内酯分别占川芎干重的 0.15% 和 0.82%;在波长为 325 nm 时,阿魏酸和藁本内酯的检出限分别为 2.0 和 2.4 ng(信噪比为 2)。

表 1 检测结果、精密度和回收率 ($n=3$)Table 1 Results of determination, precision and recovery ($n=3$)

样品 Sample	测定值 Measured value (10^{-6} g/L)	相对标准偏差 RSD (%)	SPE 回收率 Recovery of solid phase extraction (%)	实际值 Actual value (10^{-6} g/ μ L)
阿魏酸 Ferulic acid	0.1843	0.2	91.95	0.2004
藁本内酯 Ligustilide	1.0025	1.0	91.5	1.0955

References

- Xu Guojun(徐国钧), Shi Dawen(施大文). *Pharmacognosy* (生药学). Beijing(北京): People Health Press(人民卫生出版社), 1994: 298~300
- State Pharmacopeia Commission of China(国家药典委员会). *Pharmacopeia of the People's Republic of China*, Part (中华人民共和国药典(一部)). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2000: 30~31
- Pan Siyuan(潘思源), Han Yifan(韩怡凡). *Journal of Traditional Chinese Medicine*(中医杂志), 1998, 39(9): 563~565
- Luo Yunfeng(骆云丰). *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*(中医药学报), 2001, 29(5): 1~3
- Liu Xiaoping(刘小平), Huang Zhaojian(黄朝建), Zhang Yuejun(张跃军). *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*(华西药学杂志), 1989, 4(4): 248~250
- Cai Baochang(蔡宝昌), Pan Yang(潘扬), Wang Tianshan(王天山), Yang Guangming(杨光明), Zhou Houcheng(周厚成). *World Science and Technology/ Modernization of Traditional Chinese Medicine*(世界科学技术/中药现代化), 2002, 4(6): 41~45
- Ouyang Qiang(欧阳强). *Chinese Traditional Patent Medicine*(中成药), 1989, 11(9): 18
- Zhong Weichan(钟伟禅), Liang Songpei(梁颂培). *Chinese Traditional Patent Medicine*(中成药), 1997, 19(9): 32~34
- Kong Liang(孔亮), Zou Hanfa(邹汉法), Wang Hailin(汪海林), Ni Jianyi(倪坚毅), Zhang Yukui(张玉奎). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), 2000, 21(1): 36~40
- Chen Yong(陈勇), Cheng Zhiyong(程智勇), Han Fengmei(韩凤梅), Li Jun(李俊), Yang Xin(杨新). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 2000, 28(2): 186~189
- Li H X, Ding M Y, L ü K, Yu J Y. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 2001, 24(13): 2017~2031
- Tao Jingyi(陶静仪), Ruan Yuping(阮于平), Mei Qibing(梅其炳). *Acta Pharmaceutica Sinica*(药学学报), 1984, 19(8): 561~565

Determination of the Active Ingredients in Rhizoma Chuanxiong by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

Kong Liang, Yu Zhiyuan, Zou Hanfa^{*}, Sun Naichang, Wu Lihua, Ni Jianyi

(National Chromatographic Research & Analysis Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011)

Abstract The main active ingredients, *ferulic acid* and *ligustilide* in Chinese traditional medicine, *Rhizoma Chuanxiong*, were separated and identified by high performance liquid chromatography-mass spectrum (HPLC-MS). The standard ligustilide was prepared with preparative scale HPLC and identified by HPLC-diode array detection, mass spectrometry, infrared spectroscopy. Four kinds of extracting solvent and extraction time affecting on the extraction efficiency of *ferulic acid* and *ligustilide* in *Rhizoma Chuanxiong* were examined, and a quality control method was also developed based on the quantitative determination of *ferulic acid* and *ligustilide* in extracted solutions of *Rhizoma Chuanxiong* by water and ethanol. The amount of *ferulic acid* and *ligustilide* in *Rhizoma Chuanxiong* determined are as much as 0.15% (W/W) and 0.82% (W/W).

Keywords High performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Rhizoma Chuanxiong*, quality control, ferulic acid, ligustilide

(Received 31 October 2003; accepted 12 February 2004)